

METHOD FOR DETECTING MYCOPLASMA

Patent number: JP4004899
Publication date: 1992-01-09
Inventor: UEMORI TAKASHI; ASADA KIYOZOU; KATOU FUMINOSHIN; HARASAWA AKIRA
Applicant: TAKARA SHUZO CO
Classification:
- **International:** C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68
- **European:**
Application number: JP19900106354 19900424
Priority number(s): JP19900106354 19900424

Report a data error here

Abstract of JP4004899

PURPOSE: To quickly and simply detect mycoplasma in a sample in high sensitivity by detecting DNA sequence coding gammaRNA of mycoplasma. **CONSTITUTION:** Detection of mycoplasma is carried out by detecting DNA sequence coding gammaRNA of mycoplasma or detecting DNA sequence specific to mycoplasma or part thereof. Furthermore, detection of DNA sequence is carried out by PCR method using gene amplifying kid and automatic gene amplifying device containing an oligonucleotide primer and tack polymerizer for amplifying the above-mentioned DNA sequence.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

D6

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

平4-4899

⑫ Int. CL. 5

C 12 Q 1/68
C 12 N 15/11

識別記号

ZNA A

序内整理番号

6807-4B

⑬ 公開 平成4年(1992)1月9日

8717-4B C 12 N 15/00

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全13頁) A※

⑭ 発明の名称 マイコプラズマの検出方法

⑮ 特 願 平2-106354

⑯ 出 願 平2(1990)4月24日

⑰ 発明者 上森 隆司 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賀酒造株式会社中央研究所内

⑰ 発明者 浅田 起代藏 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賀酒造株式会社中央研究所内

⑰ 発明者 加藤 郁之進 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 賀酒造株式会社中央研究所内

⑰ 発明者 原澤 充 東京都足立区六月3-9-12

⑯ 出願人 賀酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地

⑰ 代理人 弁理士 中本 宏 外2名

最終頁に続く

明細書

〔従来の技術〕

1. 発明の名称

マイコプラズマの検出方法

2. 特許請求の範囲

- マイコプラズマの検出方法において、マイコプラズマのrRNAをコードしているDNA配列、又はその一部のマイコプラズマに特異的なDNA配列を検出することを特徴とするマイコプラズマの検出方法。
- 請求項1記載の方法を用いて検出を行うための検出キットであって、マイコプラズマの特異なDNA領域を増幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とするマイコプラズマ検出キット。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、マイコプラズマの検出方法に関し、更に詳細には該マイコプラズマの特異的なDNA領域の検出に関する。本発明はまた、このような検出のための検出キットに関する。

19世紀末にウシの呼吸器病の病原体として発見されたマイコプラズマは広く動物界、植物界で生息し、その一部は宿主の疾患の原因となっている。例えば、ヒトの原発性異型肺炎、ニワトリの呼吸器マイコプラズマ症、ブタのマイコプラズマ肺炎などがあり、その診断、治療、予防などの研究が活発に行われている。また、組織培養中のマイコプラズマ汚染も発見され、汚染マイコプラズマの検出方法並びに除去方法などの研究も進行している。更に、実験動物は医学・生物学の研究の上で果す重要性が近年高まり、その品質についても高度なものが要求されており、マウス、ラット等の実験動物のコロニーを維持、管理する上でもマイコプラズマ汚染の診断と予防は重要な項目となってきた。

マイコプラズマの検出方法としては、分離培養方法、DNA蛍光染色方法、生化学的方法、免疫学的方法などが開発されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記各方法は、マイコプラズマの検出方法として、通常利用されてはいるが、その操作は煩雑であり、簡便な方法ではない。一方、近年種々の遺伝子診断方法が開発されてきた。マイコプラズマの特徴はその遺伝子により規定されている。このマイコプラズマに特徴的な遺伝子配列を高感度かつ迅速に検出できればマイコプラズマの存在を簡便に、確定することができ、家畜、実験動物、組織培養等の管理が容易となる。

すなわち、本発明の目的はマイコプラズマ一般に共通な遺伝子配列を明らかにし、その検出方法及びそれに用いるキットを提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、マイコプラズマの検出方法に関し、マイコプラズマのrRNAをコードしているDNA配列、又はその一部のマイコプラズマに特異的なDNA配列を検出することを特徴とし、また第2の

配列の特定領域DNAをPCR法で増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。また増幅されたマイコプラズマDNAを検出するためのプローブも合成した。次に各マイコプラズマDNAを録型としてPCR法を行い、すべてのマイコプラズマDNAの特定領域が効率よく増幅、検出されることを見出した。

以下順を追って本発明を具体的に説明する。

マイコプラズマの検出に用いられるrRNAをコードするDNA配列としては、マイコプラズマに共通な配列であれば良いが、例えば16SrRNAースペーサー領域-23SrRNAをコードするDNA配列より共通配列を見出せば良い。マイコプラズマの16SrRNAースペーサー領域-23SrRNAをコードしているDNA配列は次のように決定される。

例えば、培養細胞汚染マイコプラズマの中で高い割合を占めるマイコプラズマ ファーメンタヌス (*Mycoplasma fermentans*) PG18株、マイコプラズマ ハイオリニス (*M. hyorhinis*)

発明は、上記第1の発明の方法を用いて検出を行うためのマイコプラズマ検出キットに関し、マイコプラズマの特異なDNA領域を增幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とする。

マイコプラズマのrRNAをコードするDNAは、16SrRNAースペーサー領域-23SrRNAースペーサー領域-5SrRNAの各DNA配列で構成されている。本発明者らは前記課題を解決するために11種のマイコプラズマのrRNAをコードしているDNA配列の一部、すなわち16SrRNAースペーサー領域-23SrRNAをコードしているDNA配列の一部を明らかにし、次にマイコプラズマ一般に共通なDNA配列を見出した。

次に、遺伝子検出方法として現在最も高感度で簡便なPCR (Polymerase Chain Reaction) 法 [サイキ (Saiki) ら、サイエンス (Science)、第230巻、第1350~1354頁、(1985)] を行うために、マイコプラズマに共通なDNA

BTS7株、マイコプラズマ オーラレ (*M. orale*) CH19299株、マイコプラズマ、ボミニス (*M. hominis*) PG21株、マイコプラズマ サリバリウム (*M. salivarium*) PG20株、マイコプラズマ アルギニニ (*M. arginini*) G230株、ウレアプラズマ ウレアリティカム (*Ureaplasma urealyticum*) T960株、マウス、ラットの病原性マイコプラズマである、マイコプラズマ ブルモニス (*M. pulmonis*) m53株、マイコプラズマ アルスリティディス (*M. arthritidis*) PG6株、マイコプラズマ ニューロリティカム (*M. neurolyticum*) PG28株、ブタの病原性マイコプラズマである、マイコプラズマ ハイオニューモニエ (*M. hyopneumoniae*) VPP11株、ヤギの病原性マイコプラズマである、マイコプラズマ カプリコラム (*M. capricolum*) CALIF、K10株をそれぞれ培養し、次にDNAを調製する。一方、マイコプラズマ カプリコラムの16SrRNAースペーサー領域-23SrRNAをコードするDNA配列 [モレキュラー アン

ド ジュネラル ジュネティックス (Molecular and General Genetics) 第 196巻、第 317 ~ 322 頁 (1984)] の本明細書の添付図面の第 1 図に示す DNA 配列より、この領域及び他のマイコプラズマ DNA も PCR 法で増幅できる一対のプライマー対、例えば下記表 1 のプライマー対を選定する。

なお、第 1 図は、マイコプラズマ カブリコラムの 1922bp の塩基配列を示す図である。

表 1

5' GTAATCGCGAATCAGCTATG 3'	プライマー 1-1
5' CACTTATCGCAGGTAGTCAC 3'	プライマー 1-2

このプライマー対は DNA 合成機により合成でき、HPLC にて精製できる。このプライマー対を用い、マイコプラズマ カブリコラム以外の上記 11 種の DNA を鉄型として PCR 反応を行い、DNA 配列決定用の DNA の増幅を行う。

PCR 法についてはタッカーポリメラーゼ (Taq-polymerase) を含む遺伝子増幅キット及び

自動遺伝子増幅装置が宝酒造社から市販されており、これと前述のプライマー対を用い、マイコプラズマ DNA の増幅反応を行う。

PCR 法としては、酵素として、例えば耐熱性タッカーポリメラーゼを用い、DNA の変性 (95°C) の工程、プライマー-DNA のアニーリング (37°C) の工程、DNA 相補鎖の酵素的合成 (72°C) の工程より成る温度サイクルを 50 回繰返し、目的遺伝子を増幅する。この場合アニーリング温度、温度サイクル回数は、鉄型 DNA とプライマー-DNA の T_m 鉄型、プライマー間の相同性を考慮して適宜選定される。

次に増幅された DNA の塩基配列を決定する。PCR 法によって増幅された DNA の塩基配列決定は、一旦 DNA を M13 又は pUC 等のファージ又はプラスミドベクターにクローニングする方法、又はこのクローニングのステップを省略し、直接 PCR 増幅 DNA を用いる方法 [ダイレクト シークエンス (Direct Sequence) 法] で決定することができる。タッカーポリメ

ラーゼを用いたイン ビトロ (in vitro) DNA 合成の際に起こりうるミスインコーポレーションに起因する DNA 配列の読み間違いを防ぐためにも、また時間、費用を節約するためにも、ダイレクト シークエンス法が有利である。

ダイレクト シークエンス法において、従来は PCR 増幅の際に 2 つのプライマー比を 1 : 100 程度にしておいて、片側の DNA 鎖を、もう一方の DNA 鎖より過剰に生じさせ [非対称 PCR (Asymmetric PCR)] 、得られた一本鎖 DNA を鉄型に用いて行うのが主流であった。しかし、この方法では、用いるプライマーによってプライミング効率が大きく異なるため、一本鎖 DNA をシークエンス反応用に十分量得るために、あらかじめ実験を行ってプライマーの濃度比を決めておく必要があった。今回のように多くのサンプルの塩基配列を決める必要がある場合は、これは実際的ではない。本発明者らは、一本鎖 DNA を生じさせないで、二本鎖 DNA をそのまま用いて塩基配列を決定する方

法を検討した。その結果、塩基配列決定用プライマーを鉄状の鉄型 DNA にアニールさせる場合において、鉄型 DNA を熱変性させた後、従来専ら用いられてきたように徐冷するのではなく急冷することによってプライマーと鉄型との会合が、鉄型同士の会合より、より優先して起こることを見出し、この急冷方法を適用することにより、二本鎖で鉄状の PCR 増幅 DNA を鉄型として用いた場合でも容易にジテオキシ法によりマイコプラズマの塩基配列を決定することができた。また、この方法を用いる場合、ラジオアイソトープ等で末端を標識したプライマーを用いれば、読み取り可能なシークエンスラダーを得るために必要な鉄型 DNA の精製法としては、PEG を用いた分別沈殿法で PCR 増幅産物からプライマーを除くという簡便な操作で十分である。

その各マイコプラズマの 16S rRNA-スペーサー領域-23S rRNA をコードする DNA 配列は、第 2 図～第 15 図に示すとおりで

ある。すなわち、第2図はマイコプラズマ ハイオリニス (480 bp) の、第3図はマイコプラズマ オーラレ (460 bp) の、第4図はマイコプラズマ サリバリウム (438 bp) の、第5図はマイコプラズマ アルギニニ (400 bp) の、第6図はマイコプラズマ ブルモニス (513 bp) の、第7図はマイコプラズマ ニューロリティカム (539 bp) の、第8図はマイコプラズマ アルスリティディス (444 bp) の、第9図はマイコプラズマ ハイオニューモニエ (731 bp) の、第10図及び第11図はマイコプラズマ ファーメンタス (522 bp) の、第12図及び第13図はマイコプラズマ ホミニス (それぞれ406 bp、及び405 bp) の、第14図及び第15図はウレアプラズマ ウレアリティカム (それぞれ517 bp、及び516 bp) のそれぞれのDNA配列を示している。

第1図～第15図のマイコプラズマDNA配列の相同性を検討し、これらのマイコプラズマ

PCR法としては使用プライマー対を選択し、次いで例えばアニーリング温度55℃、サイクル回数30回の条件でPCR反応を行えば良い。

増幅後のマイコプラズマDNAの検出は、例えばアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、スポット法、及びサザンプロット法を用いて行うことができる。スポット法、サザンプロット法の際は増幅領域内でプローブDNAを選択すれば良い。その一例としては、表3のプローブ1を、プライマー2-1、プライマー2-2を用いた場合のPCR増幅DNAの検出用プローブとして用いても良い(表3)。

表 3

5' GTTCTTGAAAAACTGAAT 3' プローブ1

プローブDNAは前記プライマーデNAと同様の方法で合成、精製することができる。プローブDNAは、標識化することにより、高感度

に特有な共通配列を選定し、検出すればマイコプラズマ一般が検出できる。これらの配列の検出方法としては、遺伝子工学的検出方法を用いれば良いが、前述のPCR法が現在最も高感度な検出方法である。PCR法であらゆるマイコプラズマDNAを増幅するためのプライマーとしては、領域内でマイコプラズマすべてに関してアニーリングできるプライマー-DNA対であれば良いし、そのようなプライマー対を複数用意して混合して使用してもよい。

プライマー対としては、例えば表2のプライマー対を、DNA合成機で合成し、HPLCで精製できる。

表2 マイコプラズマ一般を増幅させるためのプライマー

5' ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3'	プライマー-2-1
5' GCATCCACCAAAACTCT 3'	プライマー-2-2
5' GTTCTTGAAAAACTGAAT 3'	プライマー-3-1
5' GCATCCACCAAAACTCT 3'	プライマー-3-2

な検出が可能となる。

標識化の方法は放射性同位元素標識法に限らず、酵素標識、蛍光標識、ビオチン、アビジン系標識、ケミプローブ標識法等公知の方法なら何でもよい。

実際選定されたプライマーを用い、各マイコプラズマDNAの特定領域をPCR反応で増幅することができ、電気泳動法、サザンハイブリダイゼーション法等により高感度に検出することができる。

一方、個々の各マイコプラズマDNAを特異的に増幅するためには、プライマー領域内で各マイコプラズマに特異的なDNA配列となるよう、少なくとも一方のプライマーを選定すれば良い。その一例として、マイコプラズマ ハイオニューモニエだけを特異的に増幅するプライマー対として、表4に示すようなものを選定できる。

表 4 ブタ肺炎マイコプラズマ ハイオニューモニエを増幅させるためのプライマー対

5' ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3'	プライマー-4-1
5' ACCTGATTTTCATCAGAA 3'	プライマー-4-2

このようにマイコプラズマ一般に共通なDNA配列、及び各マイコプラズマに特異的なDNA配列が明らかになることにより、試料中のマイコプラズマの検出、汚染マイコプラズマの同定、病原性マイコプラズマの検出等を高感度に行うことができる。

なお、表1に示したマイコプラズマ カブリコラムのDNA配列より選択したプライマー対は、他の11種のマイコプラズマDNAをPCR法で増幅することができるが、他のマイコプラズマのDNA配列と、配列が完全に一致しておらず、PCR反応において、37℃でのアニーリングが必要で、反応サイクルも50回行うことにより増幅できる。このため、他の細菌のDNA例えば大腸菌K-12株DNAや、枯草

のDNA及びその相補鎖を高感度に検出する方法はすべて本発明に含まれるものであり、例えばQβ-レプリケース アンプリフィケーションシステム [バイオ/テクノロジー (Bio/technology)、第6巻、第1197頁 (1988年)]による方法が挙げられる。

[実施例]

以下本発明を実施例をもって詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

実施例1

マイコプラズマの16S rRNA-スペーサー領域-23S rRNAをコードしているDNA領域の塩基配列決定

(1) マイコプラズマDNAの調製

培養細胞に高頻度で汚染するマイコプラズマとして、マイコプラズマ ファーメンタンス PG18株、マイコプラズマ ハイオリニス BT S7株、マイコプラズマ オーラレCH19299株、マイコプラズマ ホミニス PG21株、マイコ

特開平4-1899 (5)

菌DNAをも増幅した。

一方、表2に示すプライマー対は、マイコプラズマに特有で、DNA配列も一致し、PCR反応において、55℃でのアニーリング、反応サイクル30回でマイコプラズマDNAを特異的に増幅し、上記細菌DNAの増幅は認められなかった。

PCR法の場合、マイコプラズマ感染細胞1個よりの検出が可能であり、マイコプラズマの早期検出が可能となり、汚染細胞、汚染動物等の管理が容易となる。

また、本発明に従って、マイコプラズマ特定DNA領域を増幅させるためのプライマー対をそろえてキットしておくことにより、マイコプラズマの検出を簡便に行うことができる。なお、キットに用いる試薬は溶液状でも良いし、凍結乾燥物でもよい。

以上PCR法を用いたマイコプラズマの高感度検出法について詳細に説明してきたが、本発明はPCR法に限定されるものではなく、特定

プラズマ サリバリウム PG20株、マイコプラズマ アルギニニG230株、ウレアプラズマ ウレアリティカムT960株、マウス病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ ブルモニス m53株、マイコプラズマ アルスリティディス PG6株、マイコプラズマ ニューロリティカム PG28株、ブタ病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ ハイオニューモニエ VPP11株、ヤギ病原性マイコプラズマとして、マイコプラズマ カブリコラム CALIF、KID株 (いずれも東大医学部附属動物実験施設より分与)を公知の改良したエドワード (Edward) 培地32を用いて、37℃で培養し、10000g、1時間遠心して培地を除いた。TE緩衝液 [10 mMトリス (Tris)-HCl、pH 7.5、1 mM EDTA] で菌体を洗浄後、ラジン (Razin) らの方法 [インターナショナル ジャーナル オブ システマチック バクテリオロジー (Int. J. Syst. Bacteriol.)、第33巻、第201~206頁 (1983)] で各マイコプラズマDNAを調製した。

(2) 各々のマイコプラズマの 16S rRNA-スペーサー領域-23S rRNAをコードしているDNA領域の塩基配列決定
マイコプラズマ カブリコラムの既知の 16S rRNA 及び 23S rRNA をコードしているDNA配列より当該領域をPCR法で増幅するための一対のオリゴヌクレオチド 表1のプライマー-1-1 及びプライマー-1-2 を選定し、プライドバイオシステムズ社のDNA合成機を用いて合成し、脱保護の後イオン交換HPLC (TSKゲル、DBAB-2SWカラム) で精製し、セーバック(SBP-PAK) C₁₈ (ウォーターズ社) でブーバク (SBP-PAK) C₁₈ (ウォーターズ社) で脱塩し、各DNAを約 50 μg 得た。

実施例 1-(1)で調製したマイコプラズマのDNA 50 ngをそれぞれ 0.5 ml用チューブに取り、10 μlの 10×増幅用緩衝液、16 μlの 1.25 mM dNTP 混合液 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 μlの 20 μM プライマー-1-1、1 μlの 20 μM プライマー-1-2、0.5 μl の 5 ユニット/μl タックーポリメラーゼを加

ンドルフチューブに移しTE (10 mMトリス-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) 緩衝液で飽和したフェノールとクロロホルムの等量混合液で抽出した後、上層を別のエッペンドルフチューブに取り、10 μlの3モル酢酸ナトリウム溶液、250 μlのエタノールを加え、かくはんして、-80℃に15分間放置後、16000 rpmで10分間遠心して上清を除去しDNA沈殿を回収した。次いで80%エタノール 200 μlを加え、16000 rpmで3分間遠心後、上清を除去した後真空乾燥した(エタノール沈殿)。単一バンドが検出された11種のマイコプラズマDNAに関しては100 μlのTE緩衝液に溶解し20%ポリエチレングリコール、2.5モル塩化ナトリウム溶液 60 μlを加えてかくはんして0℃に1時間放置後、16000 rpmで10分間遠心して上清を除去した。得られたDNA沈殿を80%エタノールで洗浄し、真空乾燥した後100 μlの水に溶かした。2種類のバンドが得られた。ウレアプラズマ ウレアリティカムに関して

え、更に滅菌水を加えて100 μlの溶液にした。

この反応液は上層に100 μlのミネラルオイル(シグマ社)を加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルーサイクター(Thermal-Cycler) (宝酒造社販売)により増幅反応を行った。反応条件は、94℃、30秒間の変性→37℃、2分間のプライマーのアニーリング→72℃、2分間の合成反応のサイクルを50サイクル行った。

反応後、上層のミネラルオイルを除去した後、反応液の2 μlを取り、1%アガロース(宝酒造社製)ゲル電気泳動を行い、エチジウムプロマイドでDNAを染色し、DNAの増幅を確認した。

その結果、ウレアプラズマ ウレアリティカムでは約 550 bp と 150 bp のバンドが検出され、他のマイコプラズマでは約 450 bp から 700 bp の単一なバンドが検出された。

次に反応液 98 μlを 1.5 ml 容の別のエッペ

は、エタノール沈殿したDNAを10 μlのTE緩衝液に溶解し1%低融点アガロース [シープラク アガロース(Sea Plaque Agarose)、宝酒造] ゲルで電気泳動後、約 550 bp の大きさのバンドを切出し、ジーンクリーン(GENE CLEAN) II キット [フナコシ薬品開] を用いてDNAを100 μlの水に抽出した。フェノールとクロロホルムの等量混合液で処理した後エタノール沈殿を行い、20 μlの水に溶解した。このようにして得られたDNAを鉄型として次のように直接ジテオキシ法によるDNA配列決定を行った。PCRによるDNA増幅に用いたプライマー-1-1、及びプライマー-1-2をメガラベル(MBGALABEL) キット(宝酒造)を用いて5'末端を³²Pでラベルした。ラベルしたプライマー-1-1、あるいはプライマー-1-2を1 pmol、鉄型DNAを約 0.8 pmol、×10 緩衝液 (7.0 mM トリス-HCl、pH 7.5、2.00 mM 塩化ナトリウム、7.0 mM 塩化マグネシウム、1 mM EDTA) 1.5 μl に水を加え 14 μl にした後、

94℃で3分間加熱し氷中で急冷した。1μlのクレノウ(2ユニット)(宝酒造)を加えて混合後3μlを4種類のdNTP-ddNTPの混合液2μlが入った4本のチューブに分注し混合した。

4種類のdNTP-ddNTPの混合液の組成は次のようである。(G) 8.3μM dATP、dTTP、4.2μM dc'GTP(7-deaza2'dGTP)、2.5μM dCTP、5.8μM ddGTP、(A) 8.3μM dc'GTP、dTTP、2.5μM dCTP、4.2μM dATP、10.0μM ddATP、(T) 8.3μM dc'GTP、dATP、2.5μM dCTP、4.2μM dTTP、20.0μM ddTTP、(C) 6.2μM dc'GTP、dATP、dTTP、2.5μM dCTP、5.0μM ddCTP。

混合した反応液を42℃で20分間保持し、チエイス混合液(1mM、dGTP、dATP、dTTP、dCTP)1μlを加え更に20分間保持した後、4μlの反応停止液(9.5%ホルムアミド、20mM BDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノールFF)を加えた。

を制限酵素HincIIで切断したDNA断片100ngをDNAライゲーションキット(宝酒造)を用いてライゲーションを行った。反応液をコーエン(Cohen)らの方法により大腸菌JM109の形質転換に用い、形質転換菌をJ.ビエイラ(J.Vieira)らの方法で選別した。3種のマイコプラズマに関して得られた白コロニーを12個ずつ選び0.5ml用チューブに5.0μlの滅菌水で懸滴し、5分間加熱処理した後、ジーン・アンプ™キット(Gene Amp™ Kit)(宝酒造社販売)に含まれている1.0μlの1.0×増幅用緩衝液[100mMトリス-HCl、pH 8.3、500mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.1% (W/V) ゼラチン]、1.6μlの1.25mM dNTP混合液(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、1μlの1.0μMのM13プライマーM4(宝酒造社製)、1μlの1.0mM M13プライマーRV(宝酒造社製)、0.5μlの5ユニット/μlタックーポリメラーゼを加え、更に滅菌水を加えて100μlの溶液にした。

94℃で3分間加熱後、氷上で急冷した後、変性ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、オートラジオグラフィー後、ラダーを読み取りDNA配列決定を行った。

マイコプラズマハイオリニス、マイコプラズマオーラレ、マイコプラズマサリバリウム、マイコプラズマアルギニニ、マイコプラズマブルモニス、マイコプラズマアルスリティディス、マイコプラズマニューロリティカム、マイコプラズマハイオニューモニエの各DNA配列は第2図～第9図に示すとおりである。

一方、マイコプラズマファーメンタヌ、マイコプラズマホミニス、ウレアプラズマウレアリティカムに関して2個のラダーが連続して生じる個所があった。これらのマイコプラズマに関しては、PCRで増幅したDNA断片約250ngをDNAブランディングキット(Blunting kit)(宝酒造)を用いて末端を平滑化した。平滑化したDNA断片50ngとpUC18

この反応液は上層に100μlのミネラルオイルを加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラーにより増幅反応を行った。反応条件は、94℃、1分間の変性→55℃、2分間のプライマーのアニーリング→72℃、2分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。

反応後、上層のミネラルオイルを除去した後、反応液の1.0μlを取り、1%アガロース(宝酒造社製)ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色し、増幅されたDNAの長さを確認し、3種類のマイコプラズマに関して増幅されたDNAを3クローンずつプライマー1-1、プライマー1-2を用いて同様に直接DNA配列決定を行った。その結果、3種類のマイコプラズマに関して2種類ずつのDNA配列を得た。その配列は第10図～第15図に示すとおりである。

実施例2

マイコプラズマDNAのPCRによる増幅
(1) オリゴヌクレオチドプライマー-DNAの合

盛及ひ箱蟹

図面に示したマイコプラズマDNAの共通配列を増幅するために選択した表2に示した2対のプライマー-DNA対をアプライドバイオシステムズ社のDNA合成機を用いて合成し、脱保護の後、イオン交換HPLC (TSKゲル、DBA8-2 SWカラム) で精製し、セブーバクC10 (ウォーターズ社) で脱塩し、各DNAを約50ng得た。

(2) マイコプラズマ共通配列DNAのPCRによる増幅

実施例 1-(1)で調製した 12 種類の各マイクロプラスmaDNA 5 ng、及び対照とするため調製したマウスDNA 5 ng、大腸菌 K-12 株DNA 5 ng、枯草菌 ISW 1214 株DNA 5 ngを錫型DNAとして、それぞれ 0.5 ml 容エッペンドルフチューブに 2 本ずつとり、10 μ l の 10 × 増幅用緩衝液、16 μ l の 1.25 mM dNTP 混合液 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) を加え、各錫型DNAの一方のチューブに 1 μ l の 20 μ M プライマー-2-1、1 μ l の 20 μ M プライマ

DNA、枯草菌 ISW 1214 株 DNA を錶型とした場合には、バンドは検出されず、各プライマー対は、マイコプラズマ rRNA をコードする DNA に特異的であった。

实施例 3

ブタ肺炎マイコプラズマ ハイオニューモニ エ DNA の PCR による増幅

(1) オリゴヌクレオチド プライマー-DNAの 合成及び精製

マイコプラズマ ハイオニュー モニエの rRNA をコードする DNA 配列より選定した、該マイコプラズマに特異的な DNA 配列を增幅するための表 3 に示したプライマー対を実施例 2- (1) と同様に合成、精製し、それぞれ約 50 ng の DNA を得た。

(2) マイコプラズマ ハイオニュー モニエ DN
A の P C R による 増幅

錫型 DNA として実施例 1-(1)で調製した各マイコプラズマ DNA 5 ng 及び前述のマウス DNA 5 ng、大腸菌 DNA 5 ng、枯草菌 DNA 5

- 2 - 2 、もう一方のチューブに $1 \mu l$ の 20 μM ブライマー-3-1 と $1 \mu l$ の 20 μM ブライマー-3-2 を加え、0.5 μl の 5 ユニット/ μl タック-ポリメラーゼを加え、更に滅菌水を加えて $100 \mu l$ の溶液にした。

この反応液は上層に 100 μ l のミネラルオイルを加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラーにより増幅反応を行った。反応条件は、94°C、30秒間の変性 → 55°C、2分間のプライマーのアニーリング → 72°C、1分間の合成反応のサイクルを 30 サイクル行った。

反応後、上層のミネラルオイルを除去した後、反応液の5μlを取り、1%アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動を行い、エチジウムプロマイドでDNAを染色し、DNAの増幅を確認した。

その結果、いずれのプライマー対を用いた場合でも各マイコプラズマについて、それぞれのDNA配列より予想される長さのバンドが検出された。しかし、マウスDNA、大腸菌K-12

ng、プライマー対として上記3-(1)で得たプライマーを用い実施例2-(2)と同様にPCR反応を行い、DNAの増幅及び検出を行った。その結果、マイコプラズマハイオニューモニエのDNAについてのみそのDNA配列より予想された長さのバンドが検出され、他のマイコプラズマDNA、マウスDNA、大腸菌DNA、枯草菌DNAを録型とした場合にはバンドは検出されず、このプライマー対はマイコプラズマハイオニューモニエを特異的に増幅した。

实施例 4

サザンハイブリダイゼーションによるマイコ プラズマ DNA の検出

(1) マイコプラズマ DNA の検出

実施例 2-②でプライマー対として、プライマー 2-1、プライマー 2-2 を用いて PCR 反応を行った反応溶液 2 μ l を 1% アガロースゲルに電気泳動し、アルカリ変性後、ナイロンメンブラン [アマーシャム ハイボンド-N (Amersham Hybond-N)] に一晩サザンプロット

した。紫外線トランスイルミネーター (254 nm) に 10 分間照射させ、DNA をメンプランに固定させた。

このメンプランは、プレハイブリダイゼーション緩衝液 (5 × デンハーツ液、5 × SSC、0.1% SDS、100 μg/ml サケ精子DNA) 5 ml 中で 50℃、2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、プローブとして、実施例 2-(1) で合成したプライマー 3-1 を用い、該プローブを ^{32}P にてラベルしたものを加え 1 晚ハイブリダイゼーションを行った。

プローブの ^{32}P ラベルはメガラベルキット (宝酒造) を用いて次のように行った。10 pmol のプローブ、1 μl の 10 × リン酸化緩衝液、50 μCi の [γ - ^{32}P] ATP (アマーシャム社)、10 ユニットの T4-ボリヌクレオチドキナーゼを含む反応液に滅菌水を加えて 10 μl にし、37℃、30 分間反応させた。反応後、94℃、5 分間処理し、この反応液の全量 (約 10⁶ cpm) をハイブリダイゼーション

に用いた。

ハイブリダイゼーション後、メンプランを 2 × SSC、0.1% SDS を含む洗浄液 1 で室温 10 分間で 4 回洗浄し、続いて 1 × SSC、0.1% SDS を含む洗浄液 2 で 55℃、50 分間で 2 回洗浄した。メンプランは乾燥させた後、X 線フィルム (富士フィルム) を入れたカセット内に -70℃、一晩感光させ、オートラジオグラフをとった。

この結果、12 種類のマイコプラズマDNA の増幅物についてはすべてバンドが検出されたが、マウスDNA、大腸菌DNA、枯草菌DNA を鏡型とした反応溶液ではバンドは認められなかった。

実施例 5

マイコプラズマDNA の増幅・検出キットの作成

試料中のマイコプラズマDNA を増幅・検出するためのキットを作成した。

マイコプラズマ共通配列増幅・検出キット

共通配列DNA 増幅用プライマーとして、表2 のプライマー 2-1 及びプライマー 2-2 が各 20 μM 溶液となるように TE 緩衝液 20 μl に溶解し、マイコプラズマ プライマー液 (A 剤) とした。また表2 のプライマー 3-1 及び 3-2 が各 20 μM 溶液となるように TE 緩衝液 20 μl に溶解し、マイコプラズマ プライマー液 (B 剤) とした。

A 剤を選択し、マイコプラズマDNA を増幅する場合のDNA 検出用プローブとして、表3 のプローブ 1 の 2 μg を TE 緩衝液 20 μl に溶解し、マイコプラズマ プローブ液 (C 剤) とした。

A 剤、B 剤、及び A 剤と C 剤の組合せでキット I ~ III を作成した (表5)。

表 5

キット I	A 剤	マイコプラズマ プライマー液	20 μl (1 μl × 20 回分)
キット II	B 剤	"	20 μl (")
キット III	A 剤	"	20 μl (")
	C 剤	マイコプラズマ プローブ液	20 μl (")

F マイコプラズマ ハイオニューモニエDNA 増幅・検出用キット

マイコプラズマ ハイオニューモニエDNA 増幅用プライマーとして、表4 のプライマー 4-1、及び 4-2 が各 20 μM 溶液となるように TE 緩衝液 20 μl に溶解し、マイコプラズマ プライマー液 (D 剤) としキット IV を作成した (表6)。

表 6

キット IV	D 剤	マイコプラズマ プライマー液	20 μl (1 μl × 20 回分)
--------	-----	----------------	-------------------------

〔発明の効果〕

以上、詳細に説明したように、本発明により、マイコプラズマ一般に共通な特異的遺伝子領域が明らかとなり、この領域を検出することによる、試料中のマイコプラズマの高感度検出方法及び検出キットが提供された。

また、新たに11種のマイコプラズマのrRNAをコードするDNA配列の一部が明らかとなり、これらの各マイコプラズマDNAに特徴的な領域の検出が可能となり、ブタ肺炎マイコプラズマ ハイオニューモニエを特異的に検出するキットも提供された。

4. 図面の簡単な説明

第1図はマイコプラズマ カブリコラムの1992bpの塩基配列を示す図、第2図はマイコプラズマ ハイオリニスの480bpの塩基配列を示す図、第3図はマイコプラズマ オーラレの460bpの塩基配列を示す図、第4図はマイコプラズマ サリバリウムの438bpの塩基配列を示す図、第5図はマイコプラズマ アルギニ

ニの400bpの塩基配列を示す図、第6図はマイコプラズマ ブルモニスの513bpの塩基配列を示す図、第7図はマイコプラズマ ニューロリティカムの539bpの塩基配列を示す図、第8図はマイコプラズマ アルスリティディスの444bpの塩基配列を示す図、第9図はマイコプラズマ ハイオニューモニエの731bpの塩基配列を示す図、第10図及び第11図のマイコプラズマ ファーメンタスのそれぞれ522bpの塩基配列を示す図、第12図及び第13図はマイコプラズマ ホミニスのそれぞれ406bp及び405bpの塩基配列を示す図、第14図及び第15図はウレアプラズマ ウレアリティカムのそれぞれ517bp及び516bpの塩基配列を示す図である。

特許出願人 寶酒造株式会社
代理人 中本 宏
同 井上 昭
同 吉嶋 桂

第1図(イの1)

5' AACCTTATCTTAAGCGAGATTTGAACTAAAGATAATTATTGATCTGAAAGAAAGATTTATTGAG
10 100 110 120 130 140 150 160
TAATAAAACCTTAACTAACATGAACTATGCAACATTTTAAATTTAAATGAGTTGATCTCTGCCTCA
15 170 190 200 210 220 230 240
GGTAAAGCTGGCGCTGGCTTACATACAGTCAACCTGAGTCAACGGGGTCTGGACCTGGAGACGGTAAACA
20 250 270 280 290 300 310 320
CGTATCTAACTCTTAAACCGGGATAACCTTGGAGAGAGAACTTACCCGATCTTACCTCTGAG
25 330 340 350 360 370 380 390
AAAAGATCAAAACCCCTTGCTTCACTATGAGTGGGGTGGCTGGATGCTGGATGCTGGATGCTGGATGCTGG
40 410 420 430 440 450 460 470 480
AGGCATGGATGGTGGCGGAACTGGAGGTGATGCTGGCTGGACCTGGGACTGAACTGGGGGGGGGGGGGG
45 500 510 520 530 540 550 560 580
CGATGGGATTTTCACTGGAGAACTCTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAA
50 570 580 590 600 610 620 630 640
CTCTGGTAAAGGGAGAAAATAGTGGAAAGTAACTGAACTTACCTTACGAGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
65 660 670 680 690 700 710 720 730
TGTCGCGGAGCGGGGTAACTAGATAGTGGCGAGGCTTAACTGGGTTAACTGGGCTTAACTGGGCTTAACTGG
75 760 770 780 790 800 810 820 830
CAAGCTTAACTTAACTGGCGCTCACTCCGGCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCA
85 860 870 880 890 900 910 920 930
AATTCAGTGTGGCTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAA
95 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030
CCTGGAGGAAAGGGGGGGAATAGGTTAACTCTGAACTGGCTTAACTGGCTTAACTGGCTTAACTGGCTTAACTGG
105 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130
GGGGTAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGG
1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220
CTAAAGCTTAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGG
1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310
GGCTTAAGTCCTCCAAACAAACGAAACGGCTTAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGGGAACTGGGG
1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
TAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490
ACAGAGCTGAACTCTGCTGAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580
CTGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670
GGGGTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
CTTAAAGCTTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850
AATGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940
TTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030
AATGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120

第1図(イの2)

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130
GACGGGGACCCGACAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220
CTAAAGCTTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310
GGCTTAAGTCCTCCAAACAAACGAAACGGCTTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
TAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490
ACAGAGCTGAACTCTGCTGAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580
CTGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670
GGGGTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
CTTAAAGCTTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850
AATGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940
TTAACTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030
AATGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120

12

第 13 図

5'	GAATGGTTCGGTTTACACCCGTCACACATGG	40
10'	GAGGGCCACTAACGGTAGACTGCTGATCTGGCTGTA	30
15'	CTCTTTCATGGGTTACCGTATGAGGAAATTG	20
20'	GAAGCTGATTCGATGATATATAATTATATTAACT	10
25'	ACAGACATTAGGTCACATTAACAGACATTAACAGGAG	10
30'	GAAGG	1

四九

—708—

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
C 12 Q 1/04		6807-4B
G 01 N 33/50	P	7055-2J
33/53	M	7906-2J
33/569	Z	9015-2J
//(C 12 Q 1/04		
C 12 R 1:00)		